

## IDENTIFICAÇÃO *IN SÍLICO* DE UMA POSSÍVEL LECTINA JACALIN-LIKE EM *XANTHOMONAS ORYZAE* pv. *ORYZAE*

AMANDA MUNARI GUIMARÃES<sup>1</sup>; GABRIELLE NAVARRO<sup>2</sup>; CHRISTIAN DOMINGUES SANCHEZ<sup>2</sup>; FREDERICO SCHMITT KREMER<sup>2</sup>; LUCIANO DA SILVA PINTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia – amanda\_munari@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Lectinas pertencem a um grupo heterogêneo de proteínas de origem não imunológica, encontradas em todos os organismos, nos quais participam de diversos processos fisiológicos. Possuem a capacidade de reconhecerem carboidrato ou glicoconjungados e ligarem-se a eles de forma reversível (LAM; NG, 2011). Estas proteínas são classificadas em diferentes famílias e subfamílias de acordo com similaridade de sequência e estrutura, sendo as jacalinas (*jacalin-like*) uma destas famílias. Este subgrupo possui um ou mais domínios com arquitetura conservada e especificidade para manose e galactose, além de já ter sido reportado que participam do reconhecimento de tumores associados ao antígeno T, associam-se a regiões específicas do HIV e possuem capacidade de reconhecerem especificamente imunoglobulina humana (KABIR, 1998; PEUMANS et al., 2001; AHMED et al., 2015; TAMMA et al., 1996; HASHIM et al., 2001). Essas proteínas em microrganismos têm recebido menos atenção quando em comparação com as encontradas em plantas e animais, embora já tenha sido demonstrado que elas podem estar envolvidas na interação hospedeiro-patógeno (BEWLEY, 2006). Segundo Gao et al (2010) as lectinas em bactérias estão associadas com o processo inicial de infecção nas células hospedeiras. No entanto, ainda existem poucas informações conhecidas sobre esse tema.

A espécie *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, uma bactéria gram negativa em forma de bastonete, é um dos microrganismos responsáveis por gerar a mais devastadora patogenia em arroz, conhecida como mancha foliar bacteriana, a qual provoca perdas de 10% a 50% no rendimento anual de produção em cultivares susceptíveis (MANSFIELD et al, 2012). O arroz (*Oryza sativa*) representa uma cultura alimentar básica para mais de metade da população mundial, sendo ele constantemente desafiado por vários microrganismos patogênicos causadores de doenças graves, que além de serem perigosos para a segurança alimentar, causam perda de rendimento, e, consequentemente, perda econômica para os produtores (GARCIA, et al 2006).

Considerando esses fatos, o estudo dessas proteínas é fundamental para o entendimento da relação hospedeiro-patógeno, além de possibilitar intervenções biotecnológicas. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo identificar potenciais proteínas deste grupo em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e realizar sua caracterização através de diferentes abordagens *in silico*.

### 2. METODOLOGIA

Para a identificação da proteína alvo do presente estudo, primeiramente uma busca foi realizada no banco de dados GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/))

para extrair as sequencias do genoma completo de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (GenBank: CP000967, CP007166, CP012947, CP013666). Posteriormente, as sequencias selecionadas foram analisadas com a ferramenta CDD-Search do *Conserved Domain Database* (CDD) (MARCHLER, 2002). Do resultado dessa busca foram selecionados somente aqueles que abrangiam os domínios com palavras-chave *lectin*, *adhesin*, *agglutinin*, *carbohydrate-binding protein*, *sugar-binding protein*, *hyaluronic acid binding protein*, *chitin binding protein*, *neuraminyllactose-binding protein*, *tenascin*, *agrin*, *lectin-like* e *heparin binding protein* utilizadas, previamente, por Abhinav *et al.*

Diferentes proteínas resultaram dessa busca, dentre elas, algumas proteínas com o domínio jacalina. Um dos resultados para jacalina foi selecionado (Uniprot: XOC\_0401) para prosseguir com as análises. O próximo passo foi submeter essa sequência de proteína à ferramenta InterProScan (ZDOBNOV, 2001) para análise de seus domínios. A busca por sequências homólogas dessa proteína foi realizada no Uniprot com a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990). A presença de peptídeo sinal foi analisada pelo software SignalP (PETERSEN *et al.*, 2011).

Para melhor entender a estrutura da proteína de interesse, realizou-se um alinhamento múltiplo utilizando a ferramenta BLAST e Uniprot, nas quais os resultados demonstraram a possível posição do peptídeo sinal na sequencia da proteína. Em relação à modelagem, o software utilizado para predição da estrutura tridimensional dessa proteína foi o HHpred (SÖDING; *et al.*, 2005), sendo sua respectiva estrutura visualizada pelo software UCSF-Chimera (YANG, 2012).

Por fim, para predizer a possível região de interação da proteína de interesse com galactose e manose, fez-se o *molecular docking* com estruturas de galactose e manose utilizando o wrapper do Autodock Vina presente no software UCSF-Chimera.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise dos domínios da sequência pelo banco de dados InterproScan foi encontrado um domínio, *jacalin-like*, que é evidenciado por ser capaz de reconhecer estruturas de manose e galactose. Nessa sequência, este domínio localiza-se entre os aminoácidos 40 e 104.

Durante a análise do gráfico gerado pelo software SignalP, não foi detectada a presença de peptídeo sinal. No entanto, quando comparou esse resultado com resultado de proteínas similares o resultado dessas foi positivo para presença de peptídeo sinal. Essa divergência pode ser justificada pelo fato dessas proteínas similares terem regiões N-terminal ('5) maiores ou menores, indicando, assim, que há possíveis erros de anotação do genoma, sendo necessário correções manuais da sequência.

O software utilizado para predição das estruturas tridimensionais dessa proteína foi o HHpred, sendo sua respectiva estrutura visualizada pelo software UCSF-Chimera (Figura 1), com o objetivo de identificar regiões mais conservada.

Após a predição da estrutura, foi realizada a análise de *molecular docking* para determinar a possível região de interação entre a proteína de estudo com os carboidratos manose e galactose (Figura 1). Essa análise revelou que o possível local de interação da proteína com a manose foi no resíduo Arginina 92 com energia de -5,8 kcal/mol. Em relação ao local de interação entre a proteína e a galactose deu-se no resíduo Alanina 93 com energia de -5,8 kcal/mol. Esses resultados sugerem que, *in silico*, a proteína estudada interage com carboidratos,

sendo ela, portanto, similar a uma jacalina, além de demonstrar que sua estrutura tridimensional gerada é capaz de desempenhar sua atividade.



**Figura 1:** Análise do sítio de ligação da proteína jacalina de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* identificada *in silico*, e da interação com os carboidratos manose (direita) e galactose (esquerda).

Em vista dos resultados obtidos a partir de uma primeira abordagem, surge a necessidade de uma análise mais detalhada das lectinas presentes em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, para que, futuramente, estudos em bancada possam ser realizados, o que inclui clonar e expressar essa proteína, além de silenciar o gene codificador para avaliar sua participação nos processos de patogenia. Outra perspectiva visada para esse trabalho é a identificação de novas proteínas com intuito de continuar a prospecção, visto que Abhinav *et al.* (2016) relatou que em 165 genomas de *Archaea*, 46 domínios de lectinas foram encontrados, sendo esses homólogos entre eucariotos e bactérias, de forma a salientar a importância do estudo dessa proteína.

#### 4. CONCLUSÕES

Através das análises *in silico* foi possível determinar a possível estrutura tridimensional da proteína em questão, além de predizer a possível região de interação dessa proteína com os carboidratos manose e galactose. Em vista desses resultados, é necessário que sejam realizadas análises mais detalhadas para a obtenção de respostas que irão auxiliar na compreensão a nível molecular da lectina e até mesmo sua possível associação com a patogênese ou outros processos biológicos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHINAV, K.V, et al. Identification of mycobacterial lectins from genomic data. *Proteins*. v.81, p. 644-657, 2013.
- ABHINAV, K.V, et al. Archeal lectins: An identification through a genomic search. *Proteins*, v.84, p. 21-30, 2016.

AHMED, K. B. A, et al. Interaction of sugar stabilized silver nanoparticles with the T-antigen specific lectin, jacalin from *Artocarpus integrifoli*. **Molecular and Biomolecular**, v.145, p. 110-116, 2015.

**Spectroscopy**

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p. 403410, 1990.

BEWLEY, CA. Protein-carbohydrate interactions in infectious diseases. **Cambridge: Royal Society of Chemistry**; 2006.

GAO, J, et al. Screening Lectin-Binding Specificity of Bacterium by Lectin Microarray with Gold Nanoparticle Probes. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 9240–9247, 2010.

GARCIA, B. A, et al. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. **Mol Plant Microbe Interact.** v.19, p. 711–724, 2006.

HASHIM, O.H., Shuib, A.S. and Chua, C.T. The interaction of selective plant lectins with neuraminidase-treated and untreated IgA1 from the sera of IgA nephropathy patients. **Immunol. Invest.** V. 30, p. 21–31, 2001.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **J Immunol Methods** v.212, p. 193–211, 1998.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. **Springer, Applied Microbiology and Biotechnology**. China. v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

MARCHLER, B. A, et al. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. **Nucleic Acids Res.** v.30, p. 281–283, 2002.

MANSFIELD, J, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. v.13, p. 614–629, 2012.

PETERSEN, T. N.; BRUNAL, S.; VON HEIKNE, G.; NIELSEN, H. Signalp 4.0: discrimination signal peptides for transmembrane regions. **Nature Methods**, v.8, p. 785-786, 2011.

PEUMANS, W.J, et al. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Adv Exp Med Biol.** v.491: 27–54, 2001.

SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, Tübingen, vol 33, n.2, p. 244-248, 2005.

TAMMA, S.M., Oyaizu, N., McCloskey, T.W., Kalyanaraman, V.S., and Pahwa, S. HIV-1 gp 120 blocks jacalin-induced proliferative response in CD4 $\beta$  T cells: jacalin as a useful surrogate marker for qualitative and quantitative deficiency of CD4 $\beta$  T cells in HIV-1 infection. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.80, p 290–297, 1996.

YANG, Z; et al. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system. **Journal of Structural Biology**. v.179: 269–278, 2012.

ZDOBNOV, E.M; APWEILER, R. InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**. v.17, p. 847–848, 2001.